

РОЗПОДІЛ S-100b У МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ПІТУЇТРИН-ІЗАДРИНОВОЇ МОДЕЛІ ІШЕМІЇ СЕРЦЯ

©О. О. Довбань, Г. О. Ушакова

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

РЕЗЮМЕ. Ішемія серця та головного мозку – ураження, що виникає внаслідок зниження кровотоку й обмеження надходження до тканин кисню і глюкози. У мозку S-100b продукують головним чином астроцити. Астроцити головного мозку найпершими реагують на метаболічний дефіцит, оскільки він є первинною ланкою у гематоенцефалічному бар'єрі між судинами та нейронами. Ішемічний стан індукує перерозподіл кальцій-зв'язуючого протеїну S-100b і підвищення його рівня. Кількісні зміни S-100b на сьогодні розглядаються як маркер мозкового пошкодження. Отримані дані вказують, що за умов експериментальної пітуїтрин-ізадринової моделі ішемії серця має місце лише незначна зміна вмісту протеїну S-100b у мозку дослідних тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: протеїн S-100b, ізадрин, пітуїтрин, експериментальна модель ішемії.

Вступ. Ішемічна хвороба серця (ІХС) – це стан, який виникає внаслідок зменшення або припинення кровопостачання серцевого м'язу, що пов'язано з патологічними процесами у серцево-судинній системі. Розвиток кардіоваскулярних захворювань призводить до порушення діяльності серця, зміни швидкості кровотоку, що веде до виникнення оксидативного стресу, активації запальних процесів не тільки в серцевому м'язі, а й опосередковано призводить до зниження забезпечення киснем мозку [1]. Обмежена подача кисню або гіпоксія головного мозку призводить до загибелі тканини мозку, інфаркту головного мозку або ішемічного інсульту [2]. Результатом ішемії можуть бути порушення обміну речовин, недостатність енергії, генерування вільних радикалів, змінений гомеостаз кальцію і активація протеаз. Інші зміни можуть включати в себе пошкодження судин, запалення, пошкодження тканин і некроз [3].

Астроцити найпершими і найпомітніше змінюються за ішемічної атаки в центральній нервовій системі (ЦНС) [4]. Вони є найчисленнішими серед клітин ненеуронного типу в ЦНС і складають близько 50 % обсягу мозку. Маркерним протеїном астроцитів є S-100b – кальцій-зв'язуючий протеїн нервової тканини, вперше виявлений Муром. Це кислий білок з молекулярною масою 21 кДа, який існує у вигляді гомодимеру, що складається з двох b субодиниць [5]. У лабораторії Р. Донато проведені роботи, які показали, що S-100b бере участь у регуляції багатьох процесів [6]. Протеїн S-100b розглядають як один із вузлових молекулярних компонентів складних внутрішньоклітинних систем, які забезпечують функціональний гомеостаз клітин мозку шляхом сполучення та інтеграції різних кальцій-залежних метаболічних процесів. При ураженні головного мозку різного генезу спостерігається зростання вмісту S-100b [7]. Коливання концентрації S-100b у мозку не завжди супроводжуються помітним погіршенням

соматичного стану тварин, але одночасно можуть призводити до різноманітних порушень інтегративної функції мозку залежно від ступеня гіперпродукції цього протеїну.

Метою роботи було дослідження розподілу астроцит-специфічного протеїну S-100b та нейропротекторної дії препарату «Корвітин» за умов експериментальної пітуїтрин-ізадринової моделі ішемії серця у щурів лінії Вістар.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження було проведено на білих щурах лінії Вістар масою 150–220 г. У щурів моделювали ішемічний стан шляхом комбінованого введення ізадрину та пітуїтрину. У роботі використовували коронароспастичний агент пітуїтрин виробництва АВ «Endokrinipia» (Литва) та β-адреноміметик ізадрин (ізопреналіну гідрохлорид) виробництва «Sigma» (USA). Введення ізадрину та пітуїтрину проводили за наступною схемою: пітуїтрин в дозі 0,5 ОД/кг – внутрішньоочеревинно, через 20 хв – ізадрин 100 мг/кг підшкірно, через 6 годин повторювали ін'єкцію ізадрину, а через 24 години вводили пітуїтрин та ізадрин в дозах, що вказані вище. Разом моделювання призводить до розвитку ішемії серця, що за клінічним станом відповідає гострому перебігу ішемічної хвороби серця.

У роботі використовували мозок 18 щурів, які були поділені на три групи (n=6): 1 група – контрольна, 2 група – щури з пітуїтрин-ізадриновою ішемією; 3 група – отримувала Корвітин (Борщівський хім-фарм. завод, Україна) після набуття ішемії за схемою, що рекомендована виробником, протягом 5 діб. Згідно з рекомендаціями, щури отримали впродовж 5 днів дев'ять внутрішньоочеревних ін'єкцій Корвітину у дозі 8,4 мг / 200 г маси тварини: 1 день – три введення з інтервалом у 1, 2 та 12 годин, 2–3 день – по два введення з інтервалом у 12 годин, 4–5 дні – по одній ін'єкції препарату з інтервалом 24 год. Експеримент проводився згідно з «Положенням про використання

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

тварин в біомедичних дослідках» [8]. Наприкінці експерименту тварин декапітували під слабким наркозом (тіопентал натрію, 40 мкг/кг). З мозку виділяли чотири відділи: мозочок, кору великих півкуль, таламус і гіпокамп, які в подальшому використовували для отримання цитозольної фракції протеїнів за допомогою диференційного центрифугування гомогенату [9]. Вихідний буфер А містив трис – 0,25 мМ (рН7,4), етилендіамінтетраоцет (ЕДТО) – 1 мМ, дитіотрейтол – 2 мМ, фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) – 0,2 мМ, азид натрію (NaN₃) – 3 мМ (вказані реагенти були придбані у Sigma, США). Рівень загального протеїну в отриманих фракціях визначали за методом Бредфорд та виражали у мг/мл [10].

Вміст S-100b у мозочку, корі великих півкуль, таламусі та гіпокампі визначали згідно з методикою конкурентного твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл проти S-100b (Sigma, США) і відповідного очищеного протеїну S-100b (Sigma, США) в якості стандарту [11]. Показники екстинкції вимірювали за допомогою ІФА-рідера Anthos 2010 (Фінляндія) при 492 нм. Кількість S-100b виражали в мкг протеїну в 100 мг тканини. Статистична обробка результатів була

проведена з використанням програми «Excel» за t-критерієм Стьюдента. Достовірними вважалися дані при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. За умов моделювання ішемії серця у щурів комбінованим введенням пітуїтрину та ізадрину визначено вірогідне зниження поведінкової активності тварин у відкритому полі та порушення діяльності серця за результатами ЕКГ (результати подані до друку).

Згідно з отриманими результатами визначено, що за пітуїтрин-ізадринової моделі ішемії серця реципрокні вірогідні зміни рівня загального протеїну цитозольної фракції відносно контрольної групи спостерігалися лише в корі великих півкуль та таламусі (рис. 1). У корі великих півкуль рівень загального протеїну контрольної групи становив $(1,16 \pm 0,18)$ мг/мл, у таламусі – $(1,57 \pm 0,19)$ мг/мл. У групі тварин, у яких моделювали ішемічний стан, рівень загального протеїну у корі великих півкуль збільшувався до $(1,77 \pm 0,2)$ мг/мл, а в таламусі за розвитку ішемії зменшувався до $(1,09 \pm 0,16)$ мг/мл. За лікування щурів Корвітином протягом 5 діб після розвитку ішемії вірогідні зміни спостерігалися лише в корі великих півкуль. Рівень загального протеїну знижувався, порівняно з групою ішемії, до $(1,26 \pm 0,21)$ мг/мл.

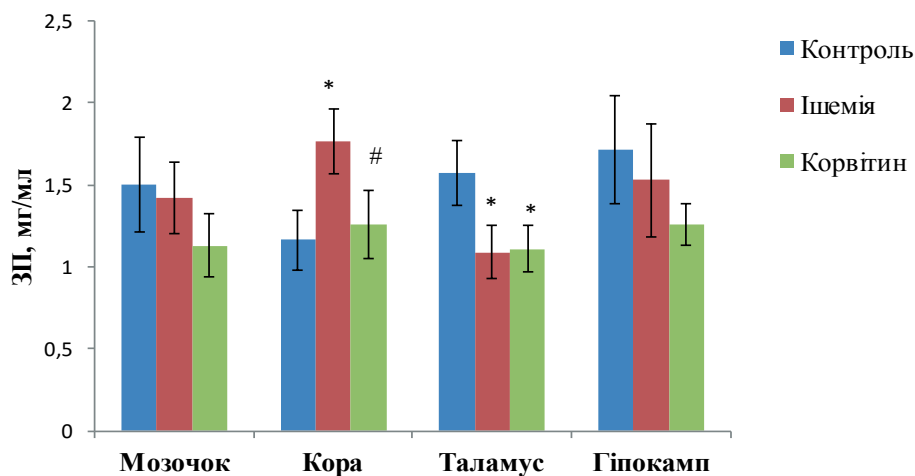


Рис. 1. Рівень загального протеїну в цитозольних фракціях, що отримані з різних відділів головного мозку щурів: $n=6$, * – $P < 0,05$ відносно контролю, # – $P < 0,05$ відносно групи тварин з ішемією.

У цитозольній фракції мозочку дослідних щурів спостерігалось зниження рівня S-100b у тварин з ішемією $((3,91 \pm 1,9)$ мкг/100 мг тканини) порівняно з контрольною групою $((4,8 \pm 2,6)$ мкг/100 мг тканини) (рис. 2). Введення Корвітину призводило до недостовірного зниження рівня досліджуваного білка, порівняно з групою ішемії. У корі великих півкуль, таламусі та гіпокампі досліджуваних груп тварин вірогідних змін концентрації S-100b не спостерігали (відбувалися коливання в межах 0,10–0,15 мкг/100 мг тканини).

S-100b часто використовують в ролі маркера ішемічного пошкодження мозку, що має прогностичне значення. Через це велика кількість публікацій присвячена оцінці кореляції рівнів S-100b з розмірами пошкодження і оцінкою обсягу інфаркту. Рівень S-100b у лікворі та крові підвищується при судинних мозкових пошкодженнях [12] і корелює з розміром інфаркту та клінічним результатом [13]. Аналіз отриманих даних вказує на те, що використана модель ішемії серця не призводить до вірогідного збільшення продукції S-100b

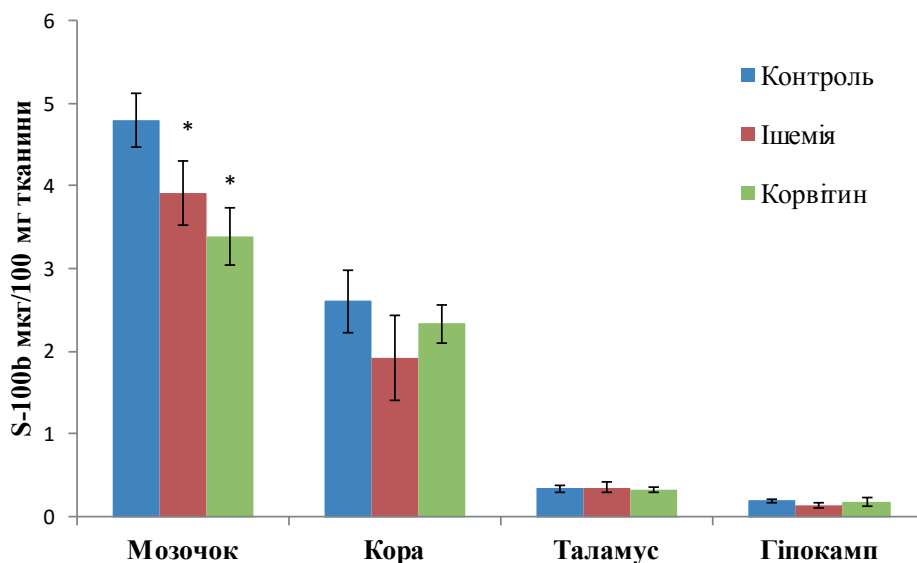


Рис. 2. Рівень S-100b протеїну в цитозольних фракціях, що отримані з різних відділів головного мозку щурів: n=6, * – P<0,05 відносно контролю.

у досліджуваних відділах мозку щурів, що зазвичай визначається при черепно-мозкових травмах [14] та фокальній ішемії мозку [15]. Згідно з отриманими результатами можна зробити висновок, що за даним протоколом пітуїтрин-ізадринової моделі ішемії серця не відбувається індукції розвитку астрогліозу, а визначається тільки гальмування синтезу S-100b у мозочку та реципрокний перерозподіл регуляції біосинтезу цитозольних протеїнів у корі великих півкуль та таламусі.

Висновки. Отримані нами дані вказують на те, що за моделювання ішемії серця комбінова-

ним введенням ізадрину та пітуїтрину має місце лише незначна зміна рівня протеїну S-100b у досліджуваних відділах мозку щурів (найбільше у мозочку), що вказує на відсутність суттєвих ушкоджень центральної нервової системи за даної моделі ішемії. Постішемичне застосування препарату «Корвітин» вірогідно не змінювало вміст S-100b. Подальші дослідження дозозалежного впливу комбінованої дії пітуїтрину та ізадрину створять підґрунтя до аналізу кореляції зміни серцевої діяльності, поведінки тварин та рівнем досліджуваного протеїну в мозку щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Electrocardiographic abnormalities in acute cerebrovascular events in patients with/without cardiovascular disease / M. Togha, A. Sharifpour, H. Ashraf [et al.] // Ann. Indian Acad. Neurol. – 2013. – Vol. 16, № 1. – P. 66–71.
2. Cell biology of ischemia/reperfusion injury / K. Theodore, P. B. Christopher, K. Maïke [et al.] // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2012. – Vol. 298. – P. 229–317.
3. Brain tissue responses to ischemia / J. M. Lee, M. C. Grabb, G. J. Zipfel [et al.] // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 106. – P. 723–731.
4. Panickar K. S. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations / K. S. Panickar, M. D. Norenberg // Glia. – 2005. – Vol. 50, № 4. – P. 287–298.
5. Risk variants in the S100B gene predict elevated S100B serum concentrations in healthy individuals / C. Hohoff, G. Ponath, C.M. Freitag [et al.] // Am. J. Med. Gen., Part B. – 2009. – Vol. 153B. – P. 291–297.
6. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal / R. Donato, G. Sorci, F. Riuzzi [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1793. – № 6. – P. 1008–1022.
7. Kochanek P. M. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making / P. M. Kochanek, R. P. Berger, H. Bayir // Curr. Opin. Crit. Care. – 2008. – Vol. 14, № 2. – P. 135–141.
8. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експерим. та клін. фізіологія та біохімія. – 2003. – Т. 22, № 2. – С. 108–109.
9. Фоменко О. З. Протеїни астроглії у мозку щурів в умовах експериментального хронічного гепатиту та дії 2-оксоглутарату / О. З. Фоменко, Г. О. Ушакова, С. Г. Пієржиновський // Укр. біохім. журн. – 2011. – Т. 83, № 1. – С. 69–75.
10. Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1985. – Vol. 72. – P. 248–254.
11. Нго Т. Т. Иммуноферментный анализ / Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф, А. Яклич. – М. : Мир. – 1998. – 444 с.
12. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders / K. J. Lam-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

ers, B. G. Van Engelen, F. J. Gabreels [et al.] // *Acta. Neurol. Scan.* – 1995. – Vol. 92. – P. 247–251.

13. Wunderlich M. T. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage / M. T. Wunderlich, A. D. Ebert, T. Kratz // *Stroke.* – 1999. – Vol. 30. – P. 1190–1195.

14. Reducing head computed tomography after mild traumatic brain injury: Screening value of clinical find-

ings and S100B protein levels / S. Asadollahi, K. Heidari, M. Taghizadeh [et al.] // *Brain Inj.* – 2016. – Vol. 30, № 2. – P. 172–178.

15. Kovalenko T. N. The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus / T. N. Kovalenko, G. A. Ushakova, I. A. Osadchenko // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 62, № 2. – P. 239–246.

DISTRIBUTION OF S-100b IN THE RAT BRAIN UNDER PITUITRIN-IZADRIN MODEL OF HEART ISCHEMIA

©O. O. Dovban, H. O. Ushakova

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University

SUMMARY. Ischemia of the heart and brain is a damage that is caused by decreased blood flow and limit the flow of oxygen and glucose to the tissue. S-100b protein is produced mainly by astrocytes in the brain. Astrocytes are the cells of the brain that give the earliest respond to metabolic deficiency as a primary element in the blood-brain barrier between blood vessels and neurons. Focal brain ischemia induces the redistribution of calcium-binding protein S-100b and the elevation of its level in the blood. Quantitative changes of S-100b are considered as a marker of brain damage. Obtained data indicate that pituitrin-izadrin induced model of heard ischemia lead just to minor changes in metabolism of S-100b protein in the rat brain.

KEY WORDS: experimental ischemia, S-100b protein, izadrin, pituitrin.

Отримано 25.08.2016